

①⑨ RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

①⑪ N° de publication :

2 848 222

(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

②① N° d'enregistrement national :

02 15279

⑤① Int Cl⁸ : **C 12 N 15/31** (2006.01), C 12 Q 1/68, 1/04, C 07 H 21/
00 // (C 12 N 15/31, C 12 R 1:64) (C 12 Q 1/04, C 12 R 1:64)

⑫

BREVET D'INVENTION

B1

⑤④ TEST DE DETECTION DE XANTHOMONAS AXONOPODIS pv DIEFFENBACHIAE.

②② Date de dépôt : 04.12.02.

③⑦ Priorité :

⑥⑦ Références à d'autres documents nationaux
apparentés :

⑦① Demandeur(s) : *CENTRE DE COOPERATION
INTERNATIONALE EN RECHERCHE
AGRONOMIQUE POUR LE DEVELOPPEMENT
Etablissement public à caractère industriel et
commercial — FR.*

⑦② Inventeur(s) : ROBENE SOUSTRADÉ ISABELLE,
LAURENT PHILIPPE et GAGNEVIN LIONEL.

④③ Date de mise à la disposition du public
de la demande : 11.06.04 Bulletin 04/24.

④⑤ Date de la mise à disposition du public du
brevet d'invention : 14.07.06 Bulletin 06/28.

⑤⑥ Liste des documents cités dans le rapport de
recherche :

Se reporter à la fin du présent fascicule

⑦③ Titulaire(s) :

⑦④ Mandataire(s) : CABINET ORES.

FR 2 848 222 - B1



La présente invention est relative à de nouveaux outils de détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* est l'agent causal du dépérissement bactérien de l'anthurium, maladie systémique sévère rencontrée dans la plupart des régions de culture de cette aracée.

Les moyens de lutte contre cette bactériose sont très limités. Les stratégies actuelles consistent
10 essentiellement en l'application de mesures prophylactiques (élimination des plants malades, désinfection des instruments de travail...) ainsi qu'en l'utilisation d'un matériel sain issu de la culture *in vitro*.

Pour que ces mesures soient efficaces, il est
15 nécessaire de disposer de méthodes permettant de détecter le plus rapidement possible une éventuelle contamination bactérienne aux différentes étapes de la production. Cependant, il n'en existe pas à l'heure actuelle. Les méthodes d'identification couramment utilisées sont basées
20 sur l'isolement de la bactérie à partir du matériel végétal infecté et sa mise en culture sur un milieu approprié. L'isolement de la bactérie prend plusieurs jours, et l'identité de la bactérie doit ensuite être vérifiée par des tests bactériologiques et/ou sérologiques. Des tests
25 utilisant un sérum polyclonal (BERTHIER-BAYLE et al., Plant Pathogenic Bacteria. Akademiai Kiado, Budapest, Hongrie, p.925-933, 1990) ou un anticorps monoclonal (LIPP et al, The American Phytopathological Society, p.677-681, 1992), et des test de pouvoir pathogène (inoculations sur plantes) ont
30 ainsi été proposés. Les techniques sérologiques citées ne sont pas suffisamment sensibles pour la détection *in planta*, particulièrement dans le cas de matériel végétal asymptomatique. NORMAN et ALVAREZ (Plant Dis. 78 :954-958, 1994) ont développé une méthode sérologique ELISA pour
35 laquelle il y a une étape préalable d'enrichissement en bactérie cible. Cette méthode est sensible mais elle présente l'inconvénient d'être peu rapide (5 jours). De plus, la

présence d'autres bactéries dans les échantillons peut dans certains cas diminuer la sensibilité du test.

Des tests d'identification par amplification PCR de séquences spécifiques du microorganisme concerné ont été développés pour d'autres bactéries du genre *Xanthomonas* :
5 *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (HARTUNG et al., Phytopathology 86 :95-101, 1996), *Xanthomonas axonopodis* pv. *manihotis* (OJEDA et VERDIER, Can. J. Plant Pathol. 22 :241-247, 2000), *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (ADACHI et OKU, J.
10 Gen. Plant Pathol. 66 :303-309, 2000) ou encore *Xanthomonas axonopodis* pv. *phaseoli* var *fuscans* (TOTH et al., J. Appl. Microbiol. 85 :327-336, 1998).

Toutefois, jusqu'à présent, aucun test de ce type n'était disponible pour *Xanthomonas axonopodis* pv.
15 *dieffenbachiae*.

Les Inventeurs ont identifié une séquence d'ADN, conservée chez toutes les souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* pathogènes sur l'anthurium, quelle que soit leur origine géographique, et absente chez les plantes hôtes de cette bactérie, et également absente d'autres microorganismes génétiquement proches mais non pathogènes pour l'anthurium. Cette séquence constitue donc une séquence-cible, dont la détection permet le diagnostic sélectif de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.
20

Cette séquence est représentée dans la liste de séquences en annexe sous le numéro SEQ ID NO: 1 ; elle est également représentée, sous forme double-brin, sur la Figure 1.
25

En conséquence, la présente invention a pour objet un polynucléotide isolé susceptible d'être obtenu à partir de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué par :
30

a) le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1 ;
35 b) tout fragment d'au moins 15 pb dudit polynucléotide ;

c) tout polynucléotide complémentaire de l'un des polynucléotides a) ou b) ;

d) tout polynucléotide capable de s'hybrider sélectivement, en conditions stringentes avec l'un des polynucléotides a) b) ou c).

Ceci englobe notamment des polynucléotides utilisables comme amorces d'amplification pour l'obtention d'une séquence d'acide nucléique conforme à l'invention, ou comme sondes d'acide nucléique pour la détection de ladite séquence.

La présente invention englobe en particulier les couples d'amorces utilisables pour l'amplification d'un polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1, ou d'un fragment d'au moins 100 pb, de préférence au moins 300 pb, et de manière tout à fait préférée au moins 500 pb dudit polynucléotide.

A titre d'exemples non-limitatifs de couples d'amorces conformes à l'invention, on citera notamment :

- le couple d'amorces constitué par les polynucléotides A1-1 (SEQ ID NO: 2) et A1-2, (SEQ ID NO: 3), qui permet l'amplification d'un fragment de 1570 pb de la séquence SEQ ID NO: 1 :

- le couple d'amorces constitué par les polynucléotides A2-1 (SEQ ID NO: 4) et A2-2, (SEQ ID NO: 5), qui permet l'amplification d'un fragment de 785 pb de la séquence SEQ ID NO: 1.

La séquence et la position de ces couples d'amorces par rapport à la séquence SEQ ID NO:1 est représentée sur la Figure 1.

La présente invention a également pour objet l'utilisation de molécules d'acide nucléique conformes à l'invention pour le dépistage de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

En particulier, la présente invention a pour objet un procédé de dépistage de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, caractérisé en ce qu'il comprend :

- la mise en présence d'ADN d'un échantillon biologique susceptible de contenir ladite bactérie avec au moins un polynucléotide conforme à l'invention, en conditions permettant une hybridation sélective entre ledit

polynucléotide et la séquence cible SEQ ID NO: 1, si celle-ci est présente dans ledit ADN ;

- la détection de ladite hybridation.

La détection de l'hybridation peut s'effectuer
5 par tous moyens connus en eux-mêmes de l'homme de l'art. Lorsque l'on utilise un polynucléotide conforme à l'invention, préalablement marqué à l'aide d'un marqueur approprié, en tant que sonde d'acide nucléique, l'hybridation de la séquence cible avec la sonde marquée est détectée
10 directement.

Lorsque l'on utilise deux polynucléotides, constituant un couple d'amorces conformes à l'invention, l'hybridation de la séquence cible avec ces amorces est détectée indirectement, par l'intermédiaire de la mise en
15 œuvre d'une réaction d'amplification en chaîne par polymérase, et détection du produit d'amplification.

Dans ce cas, le procédé de dépistage conforme à l'invention comprend au moins une étape d'amplification en chaîne par polymérase, comprenant :

- 20 - la mise en présence de l'ADN à tester avec au moins un couple d'amorces conformes à l'invention ;
- la détection du produit d'amplification.

De manière particulièrement avantageuse, on peut mettre en œuvre une réaction d'amplification en chaîne par
25 polymérase « emboîtée » (nested PCR). Dans ce cas, le procédé de dépistage conforme à l'invention comprend en outre une seconde étape d'amplification à l'aide d'un second couple d'amorces permettant l'amplification d'un fragment interne du produit d'amplification de la première étape.

30 A titre d'exemple, la première étape du procédé conforme à ce mode de mise en œuvre peut être effectuée en utilisant le couple d'amorces constitué par les polynucléotides A1-1 (SEQ ID NO: 2) et A1-2, (SEQ ID NO: 3), et la deuxième étape en utilisant le couple d'amorces
35 constitué par les polynucléotides A2-1 (SEQ ID NO: 4) et A2-2 (SEQ ID NO: 5).

L'échantillon biologique utilisé peut être une culture de bactéries isolées à partir de la plante sur

laquelle on souhaite opérer la détection. Toutefois, si l'on souhaite réaliser une détection précoce, notamment sur du matériel végétal asymptomatique, il est nécessaire de s'affranchir de la culture préalable du pathogène ; la présente invention permet d'effectuer la détection directement sur un échantillon de la plante potentiellement infectée.

Dans ce cas, afin d'éviter une éventuelle inhibition de l'amplification, qui peut être provoquée par diverses substances végétales (notamment phénoliques) présentes en quantité importante chez l'anthurium et libérées au cours du broyage, il est préférable d'éliminer ces substances inhibitrices, afin d'assurer une amplification optimale.

Les Inventeurs ont constaté que l'ajout de polyvinylpyrrolidone au broyat de matériel végétal, supprime cet effet inhibiteur et permet de détecter la bactérie avec un niveau de sensibilité égal à celui obtenu lorsque le test est réalisé sur la bactérie en culture pure.

La polyvinylpyrrolidone est généralement ajoutée au broyat de matériel végétal à raison de 0,5 à 1,5 g, de préférence environ 1 g de polyvinylpyrrolidone, pour 1 g de matériel végétal (poids frais). L'ajout de polyvinylpyrrolidone s'effectue de préférence par ajout au broyat de matériel végétal d'un volume égal d'un tampon (par exemple du tampon phosphate à pH 7) comprenant de 2,5 à 7,5% (p/v) de polyvinylpyrrolidone

La mise en œuvre de la présente invention permet de détecter la présence de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* aux différentes étapes de la filière de production. En outre, du fait que la séquence SEQ ID NO: 1 est présente dans des souches d'origine géographique diverses, il est possible d'évaluer de façon fiable l'état sanitaire du matériel végétal provenant de toutes les régions du monde touchées par la maladie.

La présente invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples non-limitatifs illustrant la mise en

œuvre de la présente invention pour la détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

EXEMPLE 1 : DETECTION SPECIFIQUE DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. DIEFFENBACHIAE SUR LA BACTERIE EN CULTURE PURE.

5 Les essais sont effectués sur des cultures pures de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

On prélève environ 1 µl de culture à l'aide d'une anse calibrée à partir d'une colonie isolée de la bactérie que l'on suspend dans 1 ml d'eau ultrapure. Après
10 homogénéisation, la suspension est mise à bouillir pendant 1 min puis immédiatement refroidie sur de la glace. L'amplification par PCR est réalisée directement sur 1 µl de cette suspension.

On ajoute 1 µl de l'extrait à un mélange contenant
15 les différents réactifs nécessaires à l'amplification (volume final 25 µl): du tampon Tris-HCl (20mM)-KCl (50mM) (pH 8,4), 1,1 mM MgCl₂, 100 µM de chaque dNTP, 0,2 µM de chaque amorce du couple SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:3, une unité de *Taq* polymérase.

20 Les tubes contenant le mélange réactionnel sont ensuite placés dans un thermocycleur (GENEAMP PCR SYSTEM 9600, PERKIN-ELMER CORPORATION, Norwalk, USA) où vont se dérouler les cycles successifs de l'amplification :

- dénaturation initiale à 94°C pendant 4 min,
- 25 - 35 cycles d'amplification comprenant chacun 3 phases : 94°C pendant 30s (dénaturation), 70°C pendant 30s (hybridation des amorces sur l'ADN) et 72°C pendant 2 min (polymérisation),
- extension à 72°C pendant 10 min.

30 Les produits d'amplification sont soumis à électrophorèse en gel d'agarose et révélés par fluorescence après coloration au bromure d'éthidium.

On observe un unique fragment d'ADN de 1570 pb sur le gel.

35 Pour augmenter la sensibilité du test et donc détecter des concentrations en bactéries plus faibles, on effectue une deuxième étape d'amplification, à partir du produit de la première étape.

Pour cette seconde étape, 1 µl du produit d'amplification obtenu avec le couple d'amorces SEQ ID NO:2/SEQ ID NO:3 est ajouté au même mélange réactionnel que précédemment (1,1 mM MgCl₂, 100 µM de chaque dNTP, une unité de *Taq* polymerase, en tampon Tris-HCl (20 mM) - KCl (50 mM) (pH 8,4), mais qui contient cette fois-ci 0,2 µM de chaque amorce du couple SEQ ID NO:4/SEQ ID NO:5.

Cette seconde amplification est réalisée dans le thermocycleur avec le programme suivant :

- pré-dénaturation à 94°C pendant 4 min,
- 20 cycles comprenant les trois phases : 94°C pendant 30s, 70°C pendant 30s, 72°C pendant 30s,
- extension à 72°C pendant 5 min.

Les produits d'amplification sont soumis à électrophorèse en gel d'agarose et visualisés sous UV après coloration au bromure d'éthidium.

Pour les échantillons positifs, on détecte un fragment unique d'ADN d'une taille de 785 pb.

Sensibilité du test :

Afin d'évaluer la sensibilité de ce test, celui-ci est effectué sur différentes concentrations bactériennes, selon le protocole à deux étapes décrit ci-dessus.

Les résultats sont illustrés par les Figures 2A et 2B. La sensibilité du test PCR a été déterminée pour différentes concentrations bactériennes après la première (figure 2A) et la seconde étape d'amplification (figure 2B). La concentration des échantillons est indiquée sous chaque piste en bactéries/ml. La piste MW correspond aux marqueurs de taille moléculaire.

Ces résultats montrent que la détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* est possible à partir d'une concentration de 10⁶ bactéries/ml après la première étape d'amplification et à partir d'une concentration de 10³ bactéries/ml après la seconde étape d'amplification.

Spécificité du test :

Le test a été effectué, selon le protocole à deux étapes décrit ci-dessus, sur des souches de *Xanthomonas*

axonopodis pv. *dieffenbachiae* de diverses provenances géographique.

Les résultats sont illustrés par la Figure 3. Dans cette figure les pistes 1 et 20 correspondent aux marqueurs de taille moléculaire et la piste 19 au témoin négatif (eau). Les pistes 2 à 18 correspondent à des souches de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* de diverses provenances géographiques : 2, Vénézuëla ; 3 et 4, Hawaï ; 5 et 6, Martinique ; 7 et 8, Guadeloupe ; 9, USA ; 10 et 11, Porto Rico ; 12 et 13, Brésil ; 14 à 16, Réunion ; 17 et 18, Tahiti. Dans tous les cas, on observe la présence d'un fragment d'amplification unique de 785 pb.

Le même test a été effectué sur d'autres espèces de *Xanthomonas*, ainsi que sur d'autres bactéries. La liste des bactéries testées est donnée dans le tableau I ci-après. Pour toutes ces bactéries, aucun fragment d'amplification n'a été détecté.

Tableau I

<i>X. pv. mangiferaeindicae</i>	<i>X. albilineans</i>	<i>Pseudomonas putida</i>
<i>X. hiacinthi</i>	<i>X. vesicatoria</i>	<i>Pseudomonas syringae</i> pv. <i>tomato</i>
<i>X. bromi</i>	<i>X. a. pv. axonopodis</i>	<i>Clavibacter mich.</i> Subsp. <i>Mich.</i>
<i>X. fragariae</i>	<i>X. a. pv. phaseoli</i>	<i>Acinetobacter</i> sp.
<i>X. translucens</i> pv. <i>translucens</i>	<i>X. a. pv. citri</i>	<i>Alcaligenes denitrificans</i>
<i>X. campestris</i> pv. <i>campestris</i>	<i>X. a. pv. vignicola</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>
<i>X. arboricola</i> pv. <i>juglandis</i>	<i>X. a. pv. begoniae</i>	<i>Chryseomonas luteola</i>
<i>X. oryzae</i> pv. <i>oryzae</i>	<i>X. a. pv. manihotis</i>	<i>Flavimonas oryzihabitans</i>
<i>X. cucurbitae</i>	<i>X. a. pv. vasculorum</i>	<i>Sphingomonas paucimobilis.</i>
<i>X. vasicola</i> pv. <i>holcicola</i>	<i>X. a. pv. cajani</i>	<i>Citrobacter</i> sp.
<i>X. cynarae</i>	<i>X. a. pv. vesicatoria</i>	<i>Enterobacter clocae</i>
<i>X. sacchari</i>	<i>X. sp. de l'oignon</i>	<i>Pantoea spp2</i>
<i>X. cassavae</i>	<i>Ralstonia pickettii</i>	<i>Pantoea spp3</i>
<i>X. melonis</i>	<i>Burkholderia cepacia</i>	<i>Proteus vulgaris</i>
<i>X. pisi</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> biov. 3	<i>Morganella morganii</i>
<i>X. vesicatoria</i>	<i>Ralstonia solanacearum</i> biov. 2	<i>Serratia maercescens</i>
<i>X. codia</i>	<i>Erwinia chrysanthemi</i>	<i>Bacillus</i> sp.
<i>X. theicola</i>	<i>Pseudomonas fluorescens</i>	
<i>X. hortorum</i>	<i>Pseudomonas cichorii</i>	

EXEMPLE 2 : DETECTION DE XANTHOMONAS AXONOPODIS PV. DIEFFENBACHIAE SUR DES ECHANTILLONS VEGETAUX INFECTES

Des fragments (environ 1 cm²) de feuilles de
 5 plants d'anthurium infectés par *Xanthomonas axonopodis* pv.
dieffenbachiae sont dilacérés à l'aide d'un scalpel dans du
 tampon Tris (10mM Tris-base, pH 7,2) à raison de 20 ml/g de
 poids frais. Après macération (10 mn), un volume égal de
 tampon PP (8,5 mM K₂HPO₄, 7,5 mM KH₂PO₄, pH 7,0, 5%
 10 polyvinylpyrrolidone (SIGMA) est ajouté au macérat. Chaque
 extrait est ensuite mis à bouillir pendant 1 min et refroidi
 aussitôt sur de la glace. L'extrait est alors prêt pour
 l'étape d'amplification par PCR.

A titre de témoin, un extrait est préparé de la
 15 même manière à partir de fragments de feuilles prélevés sur
 un plant d'anthurium non-infecté.

D'autre part, d'autres extraits sont préparés à partir de certains des plants infectés, en omettant le traitement par le tampon PP.

5 L'amplification PCR est effectuée, selon le protocole en 2 étapes décrit ci-dessus, à partir de 2 µl de chacun des extraits pour la première étape, et, pour la seconde étape, de 1 µl de l'amplifiat issu de la première étape.

Les résultats sont illustrés par la Figure 4.

10 Dans cette figure la piste 18 correspond aux marqueurs de taille moléculaire et la piste 17 au témoin (plant non infecté). Les pistes 1 à 8 et 13 à 16 correspondent à des échantillons issus de plants infectés et traités avec le tampon PP, tandis que les échantillons 9 à 12
15 correspondent à des échantillons issus de plants infectés mais non traités avec le tampon PP.

Ces résultats montrent que l'ajout du tampon PP lors du broyage du matériel végétal permet de détecter la bactérie *in planta*.

20 Pour évaluer la sensibilité du test *in planta*, les expériences suivantes ont été effectuées :

1) Des dilutions successives d'une suspension de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* (de 10^9 à 10 bactéries/ml) sont réalisées.

25 100 µl de chacune de ces dilutions sont ajoutés, soit à 900 µl de tampon Tris, soit à un mélange de 450 µl de broyat végétal obtenu comme décrit ci-dessus, à partir de feuilles non-infectées, et de 450 µl de tampon PP. Pour chaque dilution, on réalise un témoin où le tampon PP est
30 remplacé par 450 µl de tampon Tris.

Un test de détection par PCR est effectué selon le protocole en 2 étapes décrit ci-dessus.

Pour les échantillons contenant les bactéries, le broyat végétal, et le tampon PP, on obtient des résultats
35 identiques à ceux obtenus avec les échantillons ne comprenant que les bactéries et le tampon Tris. Dans les 2 cas on détecte la bactérie à partir d'une concentration de 10^3 bactéries/ml. Pour les échantillons témoin contenant les

bactéries, le broyat végétal, et le tampon Tris, on n'observe pas d'amplification, quelle que soit la concentration en bactéries.

2) Des plants d'anthurium sont infectés
5 artificiellement par *Xanthomonas axonopodis* pv.
dieffenbachiae. Des prélèvements sont faits tous les 2 jours
sur ces plants, dès le deuxième jour suivant l'inoculation.
Sur chaque échantillon on réalise un test de détection par
PCR selon le protocole en 2 étapes indiqué ci-dessus, et
10 parallèlement, un dénombrement bactérien.

La comparaison des résultats du test PCR avec
ceux du dénombrement bactérien montre que ce test permet de
détecter *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae* est
détectée à des concentrations aussi faibles que 10^3
15 bactéries/ml.

Le niveau de sensibilité du test *in planta* est
donc équivalent à celui obtenu lorsque le test est réalisé
sur la bactérie en culture pure.

REVENDICATIONS

1) Polynucléotide isolé susceptible d'être obtenu à partir de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, caractérisé en ce qu'il est choisi dans le groupe constitué
5 par :

a) le polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1 ;

b) tout fragment d'au moins 15 pb dudit polynucléotide ;

c) tout polynucléotide complémentaire de l'un
10 des polynucléotides a) ou b) ;

d) tout polynucléotide capable de s'hybrider sélectivement, en conditions stringentes avec l'un des polynucléotides a) b) ou c).

2) Couple d'amorces d'amplification utilisables
15 pour l'amplification d'un polynucléotide de séquence SEQ ID NO: 1, ou d'un fragment d'au moins 100 pb dudit polynucléotide.

3) Couple d'amorces selon la revendication 2, caractérisé en ce qu'il est choisi parmi :

20 - le couple d'amorces constitué par les polynucléotides SEQ ID NO: 2 et SEQ ID NO: 3 ;

- le couple d'amorces constitué par les polynucléotides SEQ ID NO: 4 et SEQ ID NO: 5.

4) Utilisation d'un polynucléotide selon la
25 revendication 1, et/ou d'un couple d'amorces selon une quelconque des revendications 2 ou 3, pour la détection de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*.

5) Procédé de dépistage de *Xanthomonas axonopodis* pv. *dieffenbachiae*, caractérisé en ce qu'il comprend :

30 - la mise en présence d'ADN d'un échantillon biologique susceptible de contenir ladite bactérie avec au moins un polynucléotide selon la revendication 1, en conditions permettant une hybridation sélective entre ledit polynucléotide et la séquence cible SEQ ID NO: 1 ou son
35 complémentaire, si celle-ci est présente dans ledit ADN ;

- la détection de ladite hybridation.

6) Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape d'amplification en chaîne par polymérase, comprenant :

- la mise en présence de l'ADN à tester avec au moins un couple d'amorces selon une quelconque des revendications 2 ou 3, en conditions permettant l'amplification de la séquence cible SEQ ID NO: 1 ;
- la détection du produit d'amplification.


7) Procédé selon la revendication 6, caractérisé en ce qu'il comprend une seconde étape d'amplification en chaîne par polymérase à l'aide d'un second couple d'amorces permettant l'amplification d'un fragment interne du produit d'amplification de la première étape.

8) Procédé selon une quelconque des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un broyat de matériel végétal obtenu à partir de la plante à tester.

9) Procédé selon la revendication 8, caractérisé en ce qu'il comprend l'ajout de polyvinylpyrrolidone audit broyat, préalablement à l'amplification en chaîne par polymérase.

1/5

Séquence

5'  A1-1

GCACCGAACGAAGGGCTCCCCATGCCGGAATTGGCGATCCAGGTTTCTGGCGTTTCCAAGTGCTAC
CGTGGCTTGCTTCCCGAGGGGTACGGCCTTAACCGCTAGGTCCAAAGACCGCAAAGGTTACAGATG

CAGGTCTACGATAAACCGCACGACCGGATCAAGCAGGCTGTCTACCGCGCACGCGTCGCGCGATT
GTCCAGATGCTATTTGGCGTGCTGGCCTAGTTCGTCCGACAGCATGGCGCGTGCGCAGCGCGCTAA

GGCCTAGACTCCAATCGATATTTCAAGGAGTTCTGGGCGCTGCACGACCTTTCTTTTCGAGGTCCGC
CCGGATCTGAGGTTAGCTATAAAGTTCCTCAAGACCCGCGACGTGCTGGAAAGAAAGCTCCAGGCG

AAAGGCGACACGGTCGGTATCATCGGGCGGAATGGCTCGGGCAAGTCGACGCTGCTGCAGATGATC
TTTCCGCTGTGCCAGCCATAGTAGCCCGCCTTACCGAGCCCGTTTTCAGCTGCGACGACGTCTACTAG


TGCGGCACACTCACGCCCACGACTGGCGACATCAAGGTAAAGGGCCGCGTAGCTGCGCTGCTGGAA
ACGCCGTGTGAGTGCGGGTGCTGACCGCTGTAGTTCATTTCCGGCGCATCGACGCGACGACCTT

CTCGGCGCGGGTTTCAATCCTGAGTTCACTGGGCGCGAAAACGTGTTTCATGAGCGCCGCCATCCTT
GAGCCGCGCCCAAAGTTAGGACTCAAGTGACCCGCGCTTTTGCACAAGTACTCGCGGCGGTAGGAA

GGGCTGAGTCACGAGCAGGTCGTTCGAGCGTTTGTATCGGATCGTGGCCTTCGCGGACATCGGCGAC
CCCAGTCACTGCTCGTCCAGCAGCTCGCAAACTAGCCTAGCACCGGAAGCGGCTGTAGCCGCTG

TTCGTCGATCAACCTGTCAAGGTGTATTCCAGTGGTATGTACGTGCGTCTAGCGTTTGCGGTGATC
AAGCAGCTAGTTGGACAGTTCCACATAAGGTCACCATACATGCACGCAGATCGCAAACGCCACTAG

GCGCACGTGATGCCGACATCCTGGTGGTTCGATGAGGCGCTCGCCGTCGGCGATGCGGTGTTTCGTG
CGCGTGACGCTACGGCTGTAGGACCACCAGCTACTCCGCGAGCGGCAGCCGCTACGCCACAAGCAC

 A2-1

CAGAAATGCATGCGTTTTCTGCGTTCTTTCCGCGAGCGCGGTACATTGTTGTTTCGTCAGTCATGAC
GTCTTTACGTACGCAAAAGACGCAAGAAAGGCGCTCGCGCCATGTAACAACAAGCAGTCAGTACTG

ACCAACTCGGTGCTGAGTTTTTGCCAGTCTGCGATTTGGCTGGACAAAGGGGTGATGCGCATGCAC
TGGTTGAGCCACGACTCAAAAACGGTCAGACGCTAAACCGACCTGTTTCCCCACTACGCGTACGTG

TCCAGTGCGCAAGAAACCAACCCAGGCTTACATCGAGTATTGTGCCAGGAAAGTTATGGCGATGAG
AGGTCACGCGTTCTTTGGTGGGTCCGAATGTAGCTCATAACACGGGTCCTTTCAATACCGCTACTC

FIG 1

2/5

GTAAAGCTGCAGGCACTGGACCGTCGGGAGATCAAAGGCAGTATATCTCCAGCGGACGAGCTCCG
CATTTCGACGTCCGTGACCTGGCAGCCCTCTAGTTCCGTCATATAGAGGGTCGCTGCTCGAGGC

ACCAAAACCGTGGAAGAAGTCACCCTGGAGATGTTGATAACATCGCCATTGGACGGATGGAAG
TGGTTTTGGCACCTTCTTCAGTGGGACCTCTACAAGCTATTGTAGCGGGTAAGCCTGCCTACCTTC

TCAGGCGAGGCCAGTATCGAAAGTGTCTCGTTGACCAACATCGACGATCCTTCCCGGCCCTTCTTC
AGTCCGCTCCGGTCATAGCTTTCACAGAGCAACTGGTTGTAGCTGCTAGGAAGGGCCGGAAAGAAG

TATGGTGGTGAACATGTTCTGCTGAGGATTTCCGCGCAGGTCCACCGTGACATGAATAGCCCGATT
ATACCACCACTTGTACAAGACGACTCCTAAAGGCGCGTCCAGGTGGCACTGTACTTATCGGGCTAA

GTCCGATTTTTCGTCAAAGACAGTCTCGGGCAGTCGTTGTTTGGTGAGCATACCTATACCCATGTG
CAGCCTAAAAAGCAGTTTCTGTGAGAGCCCGTCAGCAACAAACCACTCGTATGGATATGGGTACAC

CAGCCGCCGATGGAGTTAAAAGCTGGGCAAGCAGTGGAGGCCGAATTCGAGTTCTATTTGCCATTG
GTCCGGCGGCTACCTCAATTTTCGACCCGTTTCGTACCTCCGGCTTAAGCTCAAGATAAACGGTAAC

CTGCCGAATGGCGACTACTCCATGACGGTTTCCATCGCAGAGGGCGACCCAGTGACAAACACCCAG
GACGGCTTACCGCTGATGAGGTACTGCCAAAGGTAGCGTCTCCCGCTGGGTCACTGTTTGTGGGTC

CATCATTGGCTGCACGATGCGGTGATCTTGAAGGTGTCTCGCCAACCTTGCGTTATGGATTGGTC
GTAGTAACCGACGTGCTACGCCACTAGAACTTCCACAGGAGCGGTTGGAACGCAATACCTAACCAG

GGCATTCCGTTTGACCGTGTGCAGATGCAGGTGGTGGACAATCCGTGAGTGAATACGCAAGCCAGA
CCGTAAGGCAAACTGGCACACGTCTACGTCCACCACCTGTTAGGCACTCACTTATGCGTTCGGTCT

TAGTCTCTTTGCTCAGTCAGGATCCGCGCGTCCAGGTCCGCGCGCTTACCTACGGGAACCCGCAGT
ATCGAGGAAACGAGTCAGTCCTAGGCGCGCAGGTCCAGCCGGCGAAGTGGATGCCCTTGGGCGTCA

A2-2



TCAAGGTGTGGAGCGATAACGAGTCGGTGGGTATTGGGTCGTTTTGCTCGATCGCAGAAGAAGTTG
AGTTCCACACCTCGCTATTGCTCAGCCACCCATAACCCAGCAAAACGAGCTAGCGTCTTCTTCAAC

TCATCTTCGGTGGTGGCGAGCACCGTAGCGAATGGGTGACGACATTTCCCCTGCGCATTGCGTTTCG
AGTAGAAGCCACCACCGCTCGTGGCATCGCTTACCCACTGCTGTAAAGGGGACGCGTAACGCAAGC

GTGC
CACG

A1-2



3'

FIG 1 (suite)

3/5

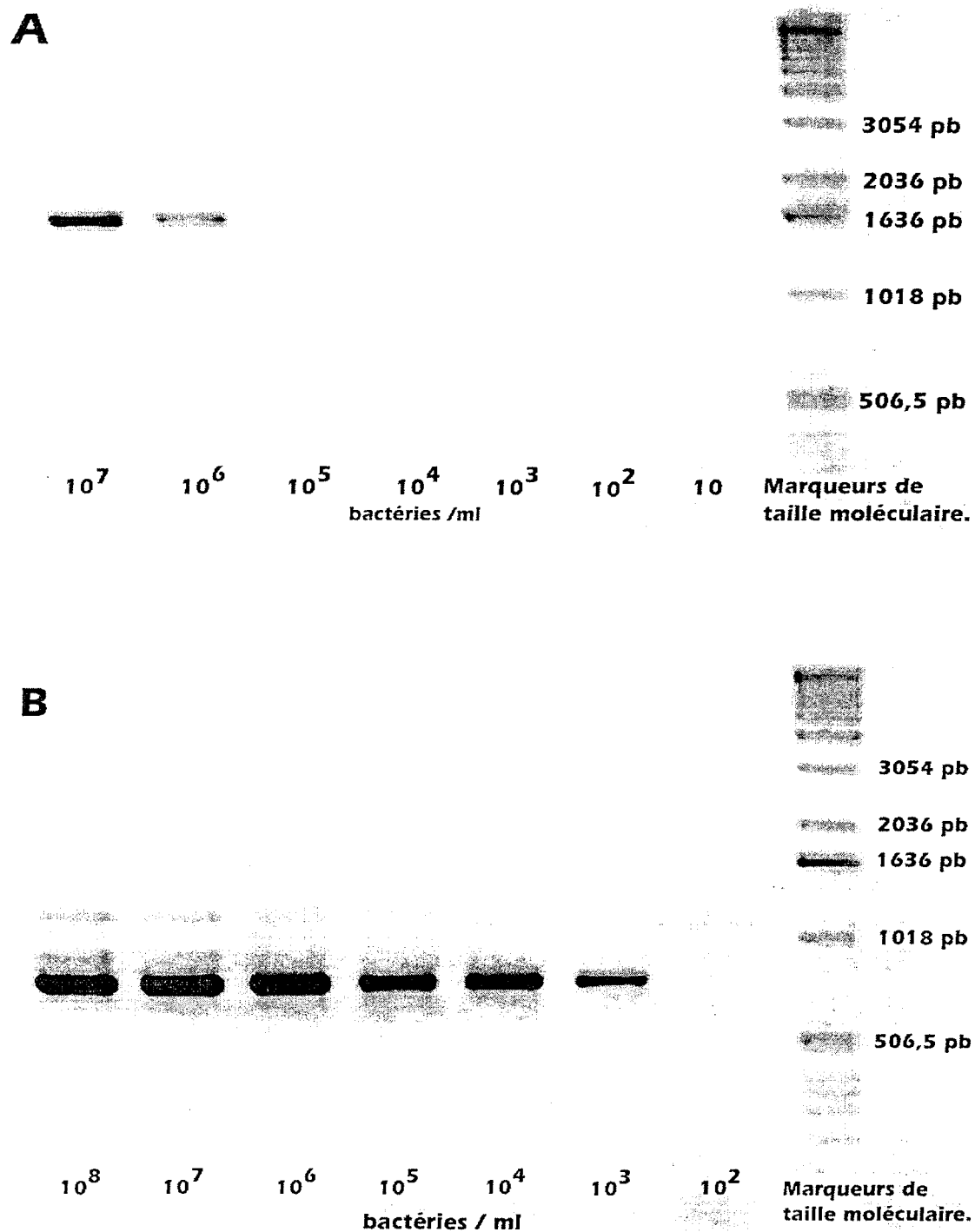


FIG 2

4/5

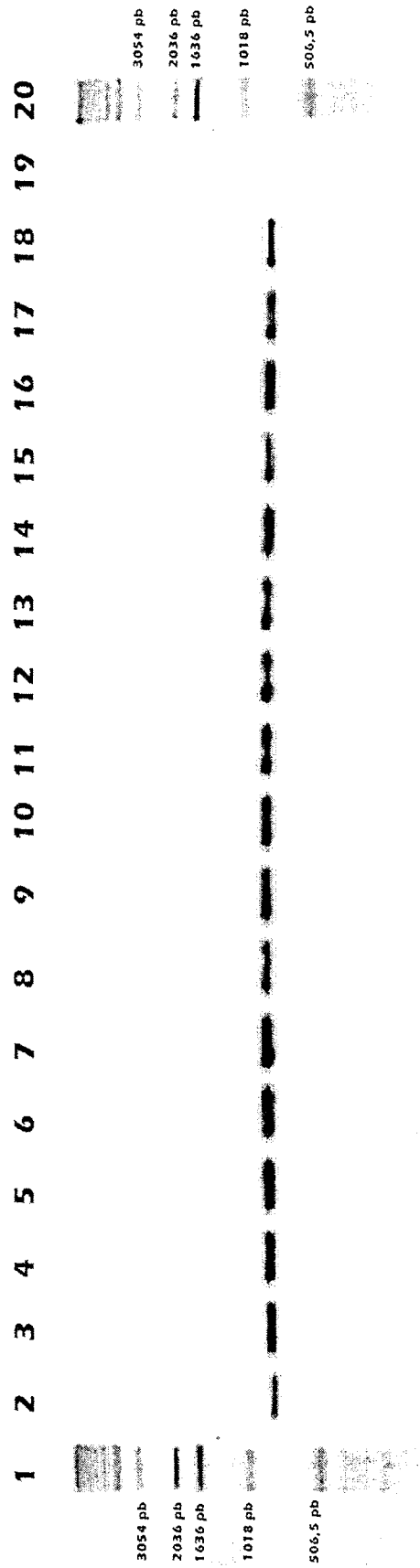


FIG 3

5/5

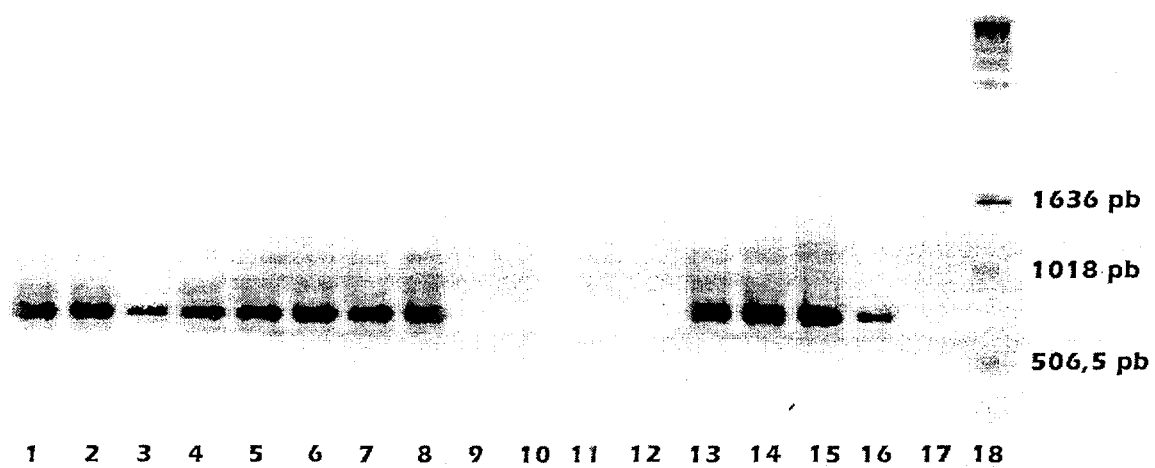


FIG 4

<110> CIRAD

<130> MJPBv1367/7

<160> 5

<170> PatentIn version 3.1

 $\langle 210 \rangle$ 1

<211>	1588
-------	------

<212> DNA

<213> Xanthomonas axonopodis pv.dieffenbachiae

 $\langle 220 \rangle$

<221> CDS

<222> (22) .. (1365)

<223>

<400> 1

gcaccgaacg aagggtccc c atg ccg gaa ttg gcg atc cag gtt tct ggc 51
Met Pro Glu Leu Ala Ile Gln Val Ser Gly
1 5 10

gtt tcc aag tgc tac cag gtc tac gat aaa ccg cac gac cgg atc aag 99
Val Ser Lys Cys Tyr Gln Val Tyr Asp Lys Pro His Asp Arg Ile Lys
15 20 25

cag gct gtc gta ccg cgc acg cgt cgc gcg att ggc cta gac tcc aat 147
Gln Ala Val Val Pro Arg Thr Arg Arg Ala Ile Gly Leu Asp Ser Asn
30 35 40

cga tat ttc aag gag ttc tgg gcg ctg cac gac ctt tct ttc gag gtc 195
Arg Tyr Phe Lys Glu Phe Trp Ala Leu His Asp Leu Ser Phe Glu Val
45 50 55

cgc aaa ggc gac acg gtc ggt atc atc ggg cgg aat ggc tcg ggc aag 243
Arg Lys Gly Asp Thr Val Gly Ile Ile Gly Arg Asn Gly Ser Gly Lys
60 65 70

tcg acg ctg ctg cag atg atc tgc ggc aca ctc acg ccc acg act ggc 291
Ser Thr Leu Leu Gln Met Ile Cys Gly Thr Leu Thr Pro Thr Thr Gly
75 80 85 90

gac atc aag gta aag ggc cgc gta gct gcg ctg ctg gaa ctc ggc gcg 339
Asp Ile Lys Val Lys Gly Arg Val Ala Ala Leu Leu Glu Leu Gly Ala
95 100 105

ggt ttc aat cct gag ttc act ggg cgc gaa aac gtg ttc atg agc gcc 387
Gly Phe Asn Pro Glu Phe Thr Gly Arg Glu Asn Val Phe Met Ser Ala
110 115 120

gcc atc ctt ggg ctg agt cac gag cag gtc gtc gag cgt ttt gat cgg 435
Ala Ile Leu Gly Leu Ser His Glu Gln Val Val Glu Arg Phe Asp Arg
125 130 135

atc gtg gcc ttc gcc gac atc ggc gac ttc gtc gat caa cct gtc aag 483
Ile Val Ala Phe Ala Asp Ile Gly Asp Phe Val Asp Gln Pro Val Lys
140 145 150

gtg tat tcc agt ggt atg tac gtg cgt cta gcg ttt gcg gtg atc gcg Val Tyr Ser Ser Gly Met Tyr Val Arg Leu Ala Phe Ala Val Ile Ala 155 160 165 170	531
cac gtc gat gcc gac atc ctg gtg gtc gat gag gcg ctc gcc gtc ggc His Val Asp Ala Asp Ile Leu Val Val Asp Glu Ala Leu Ala Val Gly 175 180 185	579
gat gcg gtg ttc gtg cag aaa tgc atg cgt ttt ctg cgt tct ttc cgc Asp Ala Val Phe Val Gln Lys Cys Met Arg Phe Leu Arg Ser Phe Arg 190 195 200	627
gag cgc ggt aca ttg ttg ttc gtc agt cat gac acc aac tcg gtg ctg Glu Arg Gly Thr Leu Leu Phe Val Ser His Asp Thr Asn Ser Val Leu 205 210 215	675
agt ttt tgc cag tct gcg att tgg ctg gac aaa ggg gtg atg cgc atg Ser Phe Cys Gln Ser Ala Ile Trp Leu Asp Lys Gly Val Met Arg Met 220 225 230	723
cac tcc agt gcg caa gaa acc acc cag gct tac atc gag tat tgt gcc His Ser Ser Ala Gln Glu Thr Thr Gln Ala Tyr Ile Glu Tyr Cys Ala 235 240 245 250	771
cag gaa agt tat ggc gat gag gta aag ctg cag gca ctg gac cgt cgg Gln Glu Ser Tyr Gly Asp Glu Val Lys Leu Gln Ala Leu Asp Arg Arg 255 260 265	819
gag atc aaa ggc agt ata tct ccc agc gga cga gct ccg acc aaa acc Glu Ile Lys Gly Ser Ile Ser Pro Ser Gly Arg Ala Pro Thr Lys Thr 270 275 280	867
gtg gaa gaa gtc acc ctg gag atg ttc gat aac atc gcc cat tcg gac Val Glu Glu Val Thr Leu Glu Met Phe Asp Asn Ile Ala His Ser Asp 285 290 295	915
gga tgg aag tca ggc gag gcc agt atc gaa agt gtc tcg ttg acc aac Gly Trp Lys Ser Gly Glu Ala Ser Ile Glu Ser Val Ser Leu Thr Asn 300 305 310	963
atc gac gat cct tcc cgg cct ttc ttc tat ggt ggt gaa cat gtt ctg Ile Asp Asp Pro Ser Arg Pro Phe Phe Tyr Gly Gly Glu His Val Leu 315 320 325 330	1011
ctg agg att tcc gcg cag gtc cac cgt gac atg aat agc ccg att gtc Leu Arg Ile Ser Ala Gln Val His Arg Asp Met Asn Ser Pro Ile Val 335 340 345	1059
gga ttt ttc gtc aaa gac agt ctc ggg cag tcg ttg ttt ggt gag cat Gly Phe Phe Val Lys Asp Ser Leu Gly Gln Ser Leu Phe Gly Glu His 350 355 360	1107
acc tat acc cat gtg cag ccg ccg atg gag tta aaa gct ggg caa gca Thr Tyr Thr His Val Gln Pro Pro Met Glu Leu Lys Ala Gly Gln Ala 365 370 375	1155
gtg gag gcc gaa ttc gag ttc tat ttg cca ttg ctg ccg aat ggc gac Val Glu Ala Glu Phe Glu Phe Tyr Leu Pro Leu Leu Pro Asn Gly Asp 380 385 390	1203

tac	tcc	atg	acg	gtt	tcc	atc	gca	gag	ggc	gac	cca	gtg	aca	aac	acc	1251
Tyr	Ser	Met	Thr	Val	Ser	Ile	Ala	Glu	Gly	Asp	Pro	Val	Thr	Asn	Thr	
395					400					405					410	

cag cat cat tgg ctg cac gat gcg gtg atc ttg aag gtg tcc tcg cca 1299
Gln His His Trp Leu His Asp Ala Val Ile Leu Lys Val Ser Ser Pro
415 420 425

acc ttg cgt tat gga ttg gtc ggc att ccg ttt gac cgt gtg cag atg 1347
Thr Leu Arg Tyr Gly Leu Val Gly Ile Pro Phe Asp Arg Val Gln Met
430 435 440

cag gtg gtg gac aat ccg tgagtgaata cgcaagccag atagctcctt 1395
Gln Val Val Asp Asn Pro
445

tgctcagtca ggatccgcgc gtccaggctcg gccgcttcac ctacgggaac ccgcagttca 1455

aggtgtggag cgataacgag tcggtgggta ttgggtcggt ttgctcgatc gcagaagaag 1515

ttgtcatctt cggtaggtggc gaggaccgta gcgaatgggt gacgacattt cccctgcgca 1575

ttgcgttcgg tgc 1588

```
<210> 2
<211> 20
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
```

```
<220>
<223> Description de la séquence artificielle: AMORCE
      OLIGONUCLEOTIDIQUE Al-1
```

```
<400> 2
agggctcccc atgccggaat 20
```

```
<210> 3
<211> 20
<212> DNA
<213> Séquence artificielle
```

```
<220>
<223> Description de la séquence artificielle: AMORCE
      OLIGONUCLEOTIDIQUE Al-2
```

```
<400> 3
acgcaatgcg caggggaaat 20
```

<210>	4
<211>	22
<212>	DNA
<213>	Séquence artificielle

```
<220>
<223> Description de la séquence artificielle: AMORCE
      OLIGONUCLEOTIDIQUE A2-1
```

```
<400>      4
agcgcggtac attgttggtc gt                22
```

<210> 5
<211> 21
<212> DNA
<213> Séquence artificielle

<220>
<223> Description de la séquence artificielle: AMORCE
OLIGONUCLEOTIDIQUE A2-2

<400> 5
gcggatcctg actgagcaaa g

21

RAPPORT DE RECHERCHE

articles L.612-14, L.612-17 et R.612-53 à 69 du code de la propriété intellectuelle

OBJET DU RAPPORT DE RECHERCHE

Après l'accomplissement de la procédure prévue par les textes rappelés ci-dessus, le brevet est délivré. L'Institut National de la Propriété Industrielle n'est pas habilité, sauf dans le cas d'absence **manifeste** de nouveauté, à en refuser la délivrance. La validité d'un brevet relève exclusivement de l'appréciation des tribunaux.

L'I.N.P.I. doit toutefois annexer à chaque brevet un "RAPPORT DE RECHERCHE" citant les éléments de l'état de la technique qui peuvent être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention. Ce rapport porte sur les revendications figurant au brevet qui définissent l'objet de l'invention et délimitent l'étendue de la protection.

Après délivrance, l'I.N.P.I. peut, à la requête de toute personne intéressée, formuler un "AVIS DOCUMENTAIRE" sur la base des documents cités dans ce rapport de recherche et de tout autre document que le requérant souhaite voir prendre en considération.

CONDITIONS D'ÉTABLISSEMENT DU PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

- ☒ Le demandeur a présenté des observations en réponse au rapport de recherche préliminaire.
- ☒ Le demandeur a maintenu les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié les revendications.
- ☐ Le demandeur a modifié la description pour en éliminer les éléments qui n' étaient plus en concordance avec les nouvelles revendications.
- ☐ Les tiers ont présenté des observations après publication du rapport de recherche préliminaire.
- ☐ Un rapport de recherche préliminaire complémentaire a été établi.

DOCUMENTS CITÉS DANS LE PRÉSENT RAPPORT DE RECHERCHE

La répartition des documents entre les rubriques 1, 2 et 3 tient compte, le cas échéant, des revendications déposées en dernier lieu et/ou des observations présentées.

- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 1 ci-après sont susceptibles d'être pris en considération pour apprécier la brevetabilité de l'invention.
- ☒ Les documents énumérés à la rubrique 2 ci-après illustrent l'arrière-plan technologique général.
- ☐ Les documents énumérés à la rubrique 3 ci-après ont été cités en cours de procédure, mais leur pertinence dépend de la validité des priorités revendiquées.
- ☐ Aucun document n'a été cité en cours de procédure.

1.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE SUSCEPTIBLES D'ETRE PRIS EN CONSIDERATION POUR APPRECIER LA BREVETABILITE DE L'INVENTION	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
<p>DATABASE EMBL 'en ligne ! ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS, AMSTERDAM, NL ; 18 mai 1998 (1998-05-18) DESHAZER ET AL. : "Burkholderia pseudomallei putative dihydroorotase (pyrC) gene, partial cds ; putative 1-acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase (plsC), putative diadenosine tetraphosphatase (apaH), complete cds ; type II O-antigen biosynthesis gene cluster, complete sequence ; putative undecaprenyl..." Database accession no. af064070 XP002241285 * abrégé *</p>	1, 2
2.ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE ILLUSTRANT L'ARRIERE-PLAN TECHNOLOGIQUE GENERAL	
<p>LOUWS F J ET AL : "Genetic diversity of xanthomonads isolated from aroids determined by rep-PCR." PHYTOPATHOLOGY, vol. 90, no. 6 Supplement, juin 2000 (2000-06), page S47 XP001152516 Annual Meeting of the American Phytopathological Society ; New Orleans, Louisiana, USA ; August 12-16, 2000 ISSN : 0031-949X</p> <p>HARTUNG JOHN S ET AL : "Rapid and sensitive colorimetric detection of Xanthomonas axonopodis pv. citri by immunocapture and a nested-polymerase chain reaction assay." PHYTOPATHOLOGY, vol. 86, no. 1, 1996, pages 95-101, XP001152515 ISSN : 0031-949X</p> <p>VERDIER VALERIE ET AL : "Methods for detecting the cassava bacterial blight pathogen : A practical approach for managing the disease." EUPHYTICA, vol. 120, no. 1, 2001, pages 103-107, XP009010867 ISSN : 0014-2336</p>	
3. ELEMENTS DE L'ETAT DE LA TECHNIQUE DONT LA PERTINENCE DEPEND DE LA VALIDITE DES PRIORITES	
Référence des documents (avec indication, le cas échéant, des parties pertinentes)	Revendications du brevet concernées
NEANT	